

# モルモット蝸牛外側壁, 非感覚細胞性上皮細胞における, 細胞外ATPによる細胞内カルシウム動員と流入

著者	鈴木 雅明
号	3148
発行年	1999
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/21888">http://hdl.handle.net/10097/21888</a>

氏 名（本籍）                      <sup>すず</sup>鈴                      <sup>き</sup>木                      <sup>まさ</sup>雅                      <sup>あき</sup>明

学 位 の 種 類                      博                      士                      （ 医                      学 ）

学 位 記 番 号                      医                      第                      3 1 4 8                      号

学位授与年月日                      平 成 11 年 3 月 3 日

学位授与の条件                      学位規則第 4 条第 2 項該当

最 終 学 歴                      平 成 元 年 3 月 31 日  
東北大学医学部医学科卒業

学 位 論 文 題 目                      Calcium mobilization and entry induced by  
extracellular ATP in the nonsensory epithelial  
cell of the cochlear lateral wall of guinea-pigs.  
（モルモット蝸牛外側壁，非感覚細胞性上皮細胞  
における，細胞外 ATP による細胞内カルシウム  
動員と流入）

（主 査）

論 文 審 査 委 員                      教授 高 坂 知 節                      教授 丸 山 芳 夫

教授 柳 澤 輝 行

## 論文内容要旨

内耳蝸牛血管条辺縁細胞における、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は、内リンパ側の細胞膜に存在する非選択的陽イオンチャンネルやカリウムチャンネルを調整し、内リンパ液のイオン環境、電位に重要な役割を持っていると考えられている。本研究は、モルモット蝸牛の外側壁を取り出し、血管条細胞とともに、ラセン隆起細胞、外ラセン溝細胞などの上皮系細胞における、ATP による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  応答のメカニズムを検討した。さらに血管条辺縁細胞の培養を成功させ、ATP による培養辺縁細胞の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  応答を調べた。細胞内イオン濃度は、急性単離されたモルモット蝸牛外側壁、および培養された辺縁細胞を、 $\text{Ca}^{2+}$  に対しては 2mM fura-2 を、 $\text{Na}^+$  に対しては 5mM SBFI をロードし、蛍光画像分析にて解析を行った。

蝸牛外側壁の上皮細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は vasopressin, phenylephrine, histamine, adenosine, また UTP により変化を受けなかった。細胞外 ATP により、蝸牛管外側壁の上皮細胞の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の濃度依存性の増加が観察された。ATP による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  増加の程度は、ラセン隆起細胞>外ラセン溝細胞>>血管条細胞の順であった。細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇は、急峻相と緩徐相の二相性の変化を示した。灌流液の  $\text{Ca}^{2+}$  を 0.2mM EGTA を用いて取り除くと、急峻相は抑制を受け、また緩徐相のない急峻な立ち上がりのみの反応となり、増加した細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  は、細胞外からの流入と細胞内貯留庫からの動員の、二つの経路が関与していると考えられた。50  $\mu\text{M}$  Mn 溶液を用いた  $\text{Mn}^{2+}$ -quenching 法により、100  $\mu\text{M}$  ATP 灌流と同時に細胞外より  $\text{Ca}^{2+}$  が、細胞内に流入することが判明した。細胞外よりの  $\text{Ca}^{2+}$  流入は、高カリウム溶液 (62mM) および、10  $\mu\text{M}$  nifedipine の投与により変化を受けず、電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  channel の関与は否定的であった。100  $\mu\text{M}$  ATP により細胞内  $\text{Na}^+$  濃度も上昇を示した。これは ATP-gated nonselective pathway の存在を示唆する。アゴニスト別の反応の強さは、2MeSATP>ATP>BzATP $\geq$ ADP> $\alpha$ ,  $\beta$ MeATP の順であった。また 20  $\mu\text{M}$  reactive blue 2 にてこれらの反応は抑制を受けた。また、ATP の完全に陰イオン化されたフォーム  $[\text{ATP}]^{4-}$  の投与をすると、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の変化は  $[\text{ATP}]^{4-}$  濃度に依存し、また  $[\text{ATP}]_{\text{total}}$  にも依存していた。これらにより、ATP 投与と同時に  $\text{P}_{2\text{Z}}$  ( $\text{P2X}_7$ ) 受容体を介した non-specific pathway による  $\text{Ca}^{2+}$  influx が起こり、それとともに、 $\text{P2Y}$  レセプターにより PLC- $\text{IP}_3$  系を介して、細胞内カルシウムストアから  $\text{Ca}^{2+}$  が放出されるという、二つのメカニズムの存在が考えられた。

内リンパ液のイオン環境、電位に重要な役割を持っているのは、血管条辺縁細胞であり、単離操作により血管条の特異的環境が変わり、生理的機能に変化をきたしている可能性もある。我々は辺縁細胞単独の生理学的メカニズムを調べるため、血管条辺縁細胞の培養を試みた。培養され

た細胞は、1) 光学顕微鏡下に、培養細胞は多角形であり、電子顕微鏡下に頭頂面から基底面にいたるまでの上皮としての極性を持ち、かつ細胞内構造は辺縁細胞のものと極めて似たものであった、2) 培養細胞は cytokeratin18 に染まり、vimentin や desmin には染色されなかった（血管条の中間細胞は神経堤、基底細胞は間葉由来であり、血管条以外の上皮は単離時に慎重に取り除かれている）、3) 生理学的に  $100\text{ }\mu\text{M}$  ouabain により細胞内  $\text{Na}^+$  濃度が上昇し、 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase 活性が強いことが証明された、ことにより、辺縁細胞由来であることが示唆された。この培養辺縁細胞を用いて、 $100\text{ }\mu\text{M}$  ATP により細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の増加が観察された。アゴニスト別の反応の強さは、 $\text{ATP} > \alpha, \beta\text{MeATP} > \text{ADP}$  の順にて、やはり  $\text{P}_2\text{Y}$  receptor であることが推定された。培養血管条細胞にて  $0.2\text{mM}$  EGTA を用いて外液の  $\text{Ca}^{2+}$  を取り除き  $100\text{ }\mu\text{M}$  ATP をかけたところ、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の変化は見られなかった。これにより細胞内からの  $\text{Ca}^{2+}$  動員が主であると考えられた。

内因性 ATP が、辺縁細胞の小胞由来であることが示唆されている。この内因性 ATP が  $\text{P}_2$  receptor を介して細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を調節し、オートクリンな作用にて、辺縁細胞頂膜上の非選択的陽イオンチャンネルやカリウムチャンネルに働くことにより、内リンパへの  $\text{K}^+$  輸送を調節し、またパラクリンな作用にて、ラセン隆起細胞、外ラセン溝細胞における  $\text{K}^+$  の吸収に働き、もしくは有毛細胞における  $\text{K}^+$  の流入に関与しての可能性が示唆される。このように ATP は  $\text{P}_2$  受容体を介して、内リンパ液のイオン環境、電位の恒常性に関与していることが推察される。

## 審 査 結 果 の 要 旨

本論文では、モルモット蝸牛の外側壁構成上皮系細胞における ATP による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  応答のメカニズムについての研究結果を報告している。細胞外 ATP により、各上皮細胞の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の濃度依存性の増加があり、程度はラセン隆起細胞>外ラセン溝細胞>血管条細胞の順であった。また、増加した細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  は、細胞外からの流入と細胞内貯蔵庫からの動員による二つの経路が考えられたが、今回の実験により、ATP 投与と同時に  $\text{P}_{2\text{Y}}$  ( $\text{P2X}_7$ ) 受容体を介した non-specific pathway による  $\text{Ca}^{2+}$  流入が起こり、それとともに、 $\text{P2Y}$  receptor により  $\text{PLC-IP}_3$  系を介して、細胞内貯蔵庫から  $\text{Ca}^{2+}$  が放出されるということが確認された。

更に、培養辺縁細胞を用いて、 $100\mu\text{M}$  ATP により細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が増加することを確認し、これは主として細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の動員によることが分かった。以上の実験結果より、蝸牛側壁上皮細胞においては、内因性 ATP が  $\text{P2}$  receptor を介して細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を調節することが確認され、オートクリンな作用にて、辺縁細胞頂膜上の非選択的陽イオンチャンネルや  $\text{K}^+$  チャンネルに働くことにより、内リンパへの  $\text{K}^+$  輸送を調節する可能性と、またパラクリンな作用にて、ラセン隆起細胞、外ラセン溝細胞における  $\text{K}^+$  の吸収に働いたり、有毛細胞における  $\text{K}^+$  の流入に関与している可能性が示唆された。

このように、本研究において、蝸牛における ATP が  $\text{P2}$  receptor を介して内リンパ液のイオン環境や電位の恒常性に強く関与している事が明かになり、聴覚医学における基礎研究の進歩に貢献することが出来た。従って、本論文は学位論文としての水準を満たしており、学位に十分値するものとする。